

D8

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年9月16日 (16.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/078966 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, [JP/JP]; 〒1838509 東京都府中市幸町3-5-8 東京農工大学 農学部内 Tokyo (JP).
A01H 5/00, 5/10, C07H 3/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002564 (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2004年3月2日 (02.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ: 特願2003-055220 2003年3月3日 (03.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 中村 博文 (NAKA-MURA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒3500289 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社ヘルス・バイオ研究所内 Saitama (JP). 窪田 英俊 (KUBOTA, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒3500289 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社ヘルス・バイオ研究所内 Saitama (JP). 川合 伸也 (KAWAI, Shinya) [JP/JP]; 〒1838509 東京都府中市幸町3-5-8 東京農工大学 農学部内 Tokyo (JP). 光成 崇 (MITSUNARI, Takashi) [JP/JP]; 〒1838509 東京都府中市幸町3-5-8 東京農工大学 農学部内 Tokyo (JP). 福富 大介 (FUKUTOMI, Daisuke)
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSGENIC PLANT HAVING FRUCTOOLIGOSACCHARIDE ACCUMULATED THEREIN AND PROCESS FOR CONSTRUCTING THE SAME

(54) 発明の名称: フラクトオリゴ糖蓄積トランスジェニック植物及びその作出方法

(57) Abstract: A process for constructing a transgenic plant having fructooligosaccharide accumulated therein which comprises the step of transforming a plant with a gene construct containing a gene encoding β -fructofuranosidase capable of converting sucrose into fructooligosaccharide; and a transgenic plant constructed by this process.(57) 要約: スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物で植物を形質転換する工程を含む、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法、及び前記方法により作出されたトランスジェニック植物を開示する。

WO 2004/078966 A1

明 細 書

フラクトオリゴ糖蓄積トランスジェニック植物及びその作出方法

技術分野

本発明は、フラクトオリゴ糖を高純度かつ高含量で蓄積するトランスジェニック植物及びその作出方法に関する。より具体的には、例えば、カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を植物で発現させ、1-kestose、nystose、又は1-フルクトフラノシルニストースの少なくとも1つの成分を蓄積するトランスジェニック植物の作出方法に関する。

背景技術

フラクトオリゴ糖は、スクロースにフルクトースが β 2 \rightarrow 1結合で結合したオリゴ糖類であり、その還元末端はグルコースである。フラクトオリゴ糖は、難う蝕性や、ビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善作用、免疫調節作用など様々な生理機能を有することが明らかになっており、機能性食品素材として産業上極めて有用である。フラクトオリゴ糖は、自然界では広く植物に分布しており、例えば、アスパラガス、タマネギ、キクイモ、又は蜂蜜などに含まれていることが知られているが、その含有量は低く、タマネギで2.8 g / 100 g程度といわれている。

近年、微生物由来の β -フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用して、スクロースからフラクトオリゴ糖を大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。工業的に使用されているカビ由来の β -フルクトフラノシダーゼは、転移活性が高いことや異性体がほとんど生成しないことが特徴であり、スクロースを基質とした酵素反応を行うことにより、重合度3~6のフラクトオリゴ糖を効率よく生成する。更に、カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼを改変することにより、親 β -フルクトフラノシダーゼにより生成するフラクトオリゴ糖の組成と異なる組成のフラクトオリゴ糖を生成する β -フルクトフラノシダーゼ変異体を得られている【国際公開第97/34004号パンフレット（特許文献

1)] 。

一方、植物に特定の遺伝子を導入して形質転換させる技術は、アグロバクテリウム・テュメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) を用いてタバコに遺伝子が導入されて以来、多くの有用形質を付与した作物が作出されてきた。また、植物に有用成分を蓄積させる試みも行われ、フラクトオリゴ糖を植物に蓄積させた例も公知となっている [国際公開第96/01904号パンフレット (特許文献2)、国際公開第03/00854号パンフレット (特許文献3)、“Nature Biotechnology” 16巻, 1998年, p. 843-846 (非特許文献1)] 。

しかしながら、前記の先行例におけるフラクトオリゴ糖の生成量は微量であり、また、フラクトオリゴ糖の異性体、例えば、1-kestoseの異性体であるネオkestoseや6-kestoseが生成されている [特許文献2, p. 56-59, 図17A・図17B、特許文献3]。また、貯蔵糖がスクロースであるビートの形質転換体の根及び葉における蓄積量は、それぞれ、1-kestoseが73.8 $\mu\text{mol/g FW}$ (3.7%) 及び0.1 $\mu\text{mol/g FW}$ 程度である [非特許文献1] 。

(特許文献1) 国際公開第97/34004号パンフレット

(特許文献2) 国際公開第96/01904号パンフレット

(特許文献3) 国際公開第03/00854号パンフレット

(非特許文献1) “Nature Biotechnology” 16巻, 1998年, p. 843-846

発明の開示

微生物由来の β -フルクトフラノシダーゼを用いて発酵生産を行う従来のフラクトオリゴ糖製造法は、製造コストが高いばかりでなく、単糖 (グルコース) が副生産物として生成されるため、オリゴ糖の特長である整腸作用・難う蝕性・低カロリー等の生理的機能を損なう問題があった。そのため、クロマト分画等により単糖類を除去する工程が必要となり、更に製造コストを増大することも問題であった。これらの問題点を解決するために、効率よく、より高純度のフラクトオ

リゴ糖を生成させる方法が望まれている。

植物にフラクトオリゴ糖を蓄積させる方法も試みられているが、高純度のフラクトオリゴ糖、特に、その構成成分である1-kestose、nystose、及び／又は1-fucotrioseを高含量でかつ高純度に蓄積するトランスジェニック植物はいまだに報告されていない。

本発明者らは、これまでに植物における発現の報告がされていなかったアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を用いて、種々の検討を重ね、植物の形質転換が可能な遺伝子構築物を調製した。更に、この遺伝子構築物を用いて植物を形質転換し、植物体として再生させることにより、フラクトオリゴ糖を蓄積できるトランスジェニック植物を作出した。通常、タバコはフラクトオリゴ糖を生成しないが、本発明のトランスジェニック植物の一例であるタバコは、約 $3 \sim 4 \mu\text{mol/g}$ の1-kestoseを生産、蓄積し、更に、1-kestoseの異性体、すなわち、6-kestose及びネオkestoseが検出されないという、これまでにない特性を有する。また、本発明のトランスジェニック植物の別の一例であるビートは、その葉中に約 $0.15 \mu\text{mol/g}$ の1-kestoseを生産、蓄積し、更に、1-kestoseの異性体、すなわち、6-kestose及びネオkestoseが検出されないという、これまでにない特性を有する。

従って、本発明は、スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼを含む遺伝子構築物で植物を形質転換し、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法、並びに前記方法で作出されたトランスジェニック植物、その子孫植物、及びそれらの種子を提供するものである。更に、本発明のトランスジェニック植物、その子孫植物、及びそれらの種子を用いたフラクトオリゴ糖の製造方法を提供するものである。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物で植物を形質転換する工程を含む、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法。

(2) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス (*A*

aspergillus) 属に属する微生物由来、ペニシリウム (Penicillium) 属に属する微生物由来、又はスコプラリオプシス (Scopulariopsis) 属に属する微生物由来である、(1) に記載の方法。

(3) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 由来である、(2) に記載の方法。

(4) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、下記からなる群より選択される、(1) に記載の方法：

(a) 配列番号 1 で表わされる塩基配列からなる遺伝子、

(b) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含む遺伝子、

(c) 配列番号 1 で表わされる塩基配列において、1 個又は複数個の塩基が欠失、置換、又は付加された塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、及び

(d) 配列番号 1 で表される塩基配列と 85% 以上の相同性を有する塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子。

(5) 遺伝子構築物が、構成的プロモーター、器官特異的プロモーター又は生育ステージ特異的プロモーターに機能し得るように連結された β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んでなる、(1) ~ (4) のいずれか一項に記載の方法。

(6) プロモーターが、下記からなる群より選択される、(5) に記載の方法：

(i) CaMV 35S プロモーター、

(ii) サツマイモのスポラミン A プロモーター、及び

(iii) サツマイモのスポラミン B プロモーター。

(7) トランスジェニック植物が、双子葉植物又は単子葉植物である、(1) ~ (6) のいずれか一項に記載の方法。

(8) トランスジェニック植物が、ナス科、アカザ科又はイネ科に属する植物である、(7) に記載の方法。

(9) トランスジェニック植物が、タバコ属、フダンソウ属、又はサトウキビ属に属する植物である、(8) に記載の方法。

(10) (1) ~ (9) のいずれか一項に記載の方法により作出されたトランスジェニック植物又はその子孫植物。

(11) (10) に記載のトランスジェニック植物又はその子孫植物の種子。

(12) (10) に記載の植物若しくは子孫植物又は(11)に記載の種子を栽培する工程、及び植物体内に蓄積されたフラクトオリゴ糖を採取する工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

発明を実施するための最良の形態

β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子

β -フルクトフラノシダーゼは、IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) による分類でEC 3. 2. 1. 26 に分類されている加水分解酵素の1つである。本発明で用いることのできる β -フルクトフラノシダーゼは、スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼである限り、特に限定されるものではない。

本発明におけるフラクトオリゴ糖とは、スクロースにフルクトースが β 2 \rightarrow 1 結合で重合した重合度3以上のフルクタンであり、還元末端にはグルコースが結合している。重合度3のフルクタンが1-kestose、重合度4のフルクタンがnystose、重合度5のフルクタンが1-fructofuranosyl nystoseである。本発明では、特に重合度3~5のフラクトオリゴ糖を効率よく生産することを目的としている。

そこで、本発明では、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子の選定が重要となる。カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼは、植物や細菌由来のフラクトオリゴ糖生成酵素と比較して、比活性が高く、広いpH領域と温度領域で作用するために効率よくフラクトオリゴ糖を生成し、異性体の生成がほとんど見られないという好ましい特徴を有する。

本発明における好適な β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子として、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する微生物由来、ペ

ニシリウム (Penicillium) 属に属する微生物由来、又はスコプラリオプシス (Scopulariopsis) 属に属する微生物由来の遺伝子が挙げられる。より好ましくは、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 由来の遺伝子が挙げられる。具体的な例として、国際公開第97/34004号パンフレットに記載のアスペルギルス・ニガー ACE-2-1 (ATCC20611) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号2)、ペニシリウム・ロッケフォルチ (IAM7254) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号12)、及びスコプラリオプシス・プレビカウリス (IFO4843) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号14)、並びに国際公開第99/13059号パンフレットに記載のペニシリウム・ロッケフォルチ (IAM7254) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号2)、及びスコプラリオプシス・プレビカウリス (IFO4843) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号4) が挙げられる。

また、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、下記からなる群より選択することができる：

- (a) 配列番号1で表わされる塩基配列からなる遺伝子、
- (b) 配列番号1で表わされる塩基配列を含む遺伝子、
- (c) 配列番号1で表わされる塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、又は付加された塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、及び
- (d) 配列番号1で表される塩基配列と85%以上の相同性を有する塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子。

前記遺伝子(b)は、配列番号1で表わされる塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子である限り、特に限定されるものではない。前記遺伝子(b)としては、例えば、配列番号1で表わされる塩基配列の5'末端及び/又は3'末端に、適当なマーカー配列及び/又は融合用パートナーをコードする塩基配列が

付加された塩基配列からなる遺伝子を挙げることができる。

前記マーカ配列としては、例えば、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを用いることができる。

また、前記融合用パートナーとしては、例えば、精製用ポリペプチド [例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) の全部又は一部]、検出用ポリペプチド [例えば、ヘマグルチニン又は β -ガラクトシダーゼ α ペプチド (lacZ α) の全部又は一部]、又は発現用ポリペプチド (例えば、シグナル配列) などを用いることができる。

前記遺伝子 (c) において、欠失、置換、又は付加されてもよい塩基の数は、具体的には1~60個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~15個である。

より具体的には、国際公開第97/34004号パンフレットの実施例D1~D11に記載されている方法で得られる変異体をコードする遺伝子が挙げられる。具体的には、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) ATCC20611株由来の β -フルクトフラノシダーゼの各種変異体である、F170W変異体、G300W変異体、H313K変異体、E386K変異体、F170W+G300W変異体、F170W+G300W+H313R変異体、G300W+H313K変異体、G300V+H313K変異体、G300E+H313K変異体、G300D+H313K変異体、F170W+G300W+H313K変異体、又はF170W+G300V+H313K変異体を挙げることができる。なお、前記変異体の名称は、

原アミノ酸：位置：置換アミノ酸

を意味しており、例えば、170番目のフェニルアラニン (F) をトリプトファン (W) に置換したものは「F170W」として示される。また、多数の変異は、記号「+」によって表わされ、例えば、「F170W+G300V+H313K」は、170、300、及び313番目のアミノ酸であるフェニルアラニン、グリシン (G)、及びヒスチジン (H) が、それぞれトリプトファン、バリン

(V)、及びリジン(K)に置換されていることを示す。

β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、好ましくは国際公開第97/34004号パンフレット又は国際公開第99/13059号パンフレットに記載の方法に従って調製することができる。より具体的には、国際公開第97/34004号パンフレット実施例A、実施例D1を参照してプラスミドpAN120(同パンフレット図6)を調製した後、BamHIで消化することにより、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) ATCC20611株由来の β -フルクトフラノシダーゼ(Fase) cDNAを得ることができる。

前記遺伝子(d)において、配列番号1で表される塩基配列との相同性は、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましく、98%以上であることが更に好ましく、99%以上であることが特に好ましい。

ここで示した相同性の数値は、当業者に公知の相同性検索プログラムであるBLAST法(Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990)を用いて算出される数値である。

遺伝子構築物

上記のようにして得られる β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、又はそれを含有するプラスミドを基に、更に植物体で発現可能な遺伝子構築物(植物プラスミド又はバイナリーベクター)を調製することができる。

本発明に使用される遺伝子構築物は、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、及び植物体内で機能する適切なプロモーターの他に、適切なターミネーター(例えば、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター、又はCMV35Sターミネーター等)、発現制御に有用なエレメント、及び/又は形質転換体を選抜するための適切なマーカー遺伝子(例えば、カナマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、又はG418耐性などの薬剤耐性遺伝子)を含むことができる。

植物体内で機能する適切なプロモーターとは、例えば、構成的プロモーター、器官特異的プロモーター、又は生育ステージ特異的プロモーター等が挙げられる。構成的プロモーターとは、植物の器官や生育条件等に関係なく、常に一定量発現

させるプロモーターであり、例えば、カリフラワー・モザイク・ウイルス・35S・プロモーター等が挙げられる。器官特異的プロモーターとは、特定の器官（例えば、根、葉、又は莖など）で特異的に発現させるプロモーターであり、例えば、スポラミンAプロモーター又はスポラミンBプロモーター等が挙げられる。生育ステージ特異的プロモーターとは、特定の生育段階（例えば、発芽期又は結実期など）で特異的に発現させるプロモーターである。これらプロモーターは、例えば、使用する宿主、発現させるべき器官・組織、及び／又は生育ステージ等に応じて適切に選択することができる。また、本発明に使用されるプロモーターは、植物内に導入した場合に、RNAポリメラーゼが特異的に結合してその下流方向に転写をはじめることができるプロモーターを意味する。好ましくは以下の群から選択される：

(i) カリフラワー・モザイク・ウイルス・35S・プロモーター (CaMV 35Sプロモーター)、

(ii) サツマイモのスポラミンAプロモーター、及び

(iii) サツマイモのスポラミンBプロモーター。

例えば、塊根中で β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を発現させるには、サツマイモのスポラミンプロモーターが好ましい。サツマイモ (*Ipomoea batatas*) は貯蔵タンパク質としてスポラミンを産生し、これはサツマイモ塊根の全可溶性タンパク質の60～80%を占めている。このスポラミンをコードする遺伝子は多重遺伝子族を形成しており、その相同性からスポラミンA遺伝子とスポラミンB遺伝子に分類されている。いずれの遺伝子も塊根で特異的に発現するプロモーターを持つ。また、スポラミンプロモーターは、糖類、特にスクロースで誘導される特徴を有する。

本発明に使用される遺伝子構築物の構築手順は特に限定されるものではないが、例えば、以下のようにして調製することができる。すなわち、アスペルギルス・ニガー由来の β -フルクトフラノシダーゼcDNAをpBI121（クローンテック社製）のCaMV 35Sプロモーターの下流に存在するBamHI部位に挿入し、必要に応じて β -グルクロニダーゼ遺伝子を除去してバイナリーベクターを得ることができる。前記ベクターは、 β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子上流

にCaMV35Sプロモーターが、下流にはTiプラスミドのヘパリン合成酵素遺伝子のターミネーターが連結されているので、前記ベクターの β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子は植物での発現が可能となる。また、前記ベクターにはカナマイシン耐性遺伝子が存在し、大腸菌等の微生物や植物においてカナマイシン耐性を付与することができる。

β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の植物体への導入、発現

本発明で使用される植物体への遺伝子導入法は特に限定されず、植物細胞又は植物体への遺伝子導入法として当業者に公知のいずれの方法を使用してもよい。例えば、本発明の好適な実施態様の一つとして、遺伝子構築物を植物に導入するためにアグロバクテリウムが用いられる。植物を形質転換するためにアグロバクテリウムを用いる場合、導入すべき塩基配列に隣接する位置にT-DNA領域のボーダー配列を連結させることができる。このようなT-DNAを用いる形質転換ベクターの適切な構築は当業者に公知である。

別の実施態様として、カルシウム及び／若しくはポリエチレングリコールを使用した導入法、エレクトロポレーション法、又はパーティクルガン法等が挙げられる。

また、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を導入する植物は、特に限定されないが、好ましくは双子葉植物又は単子葉植物である。より好ましくは、双子葉植物ではナス科又はアカザ科、単子葉植物ではイネ科が挙げられる。更に好ましくは、ナス科タバコ属、アカザ科フダンソウ属、又はイネ科サトウキビ属が挙げられる。特により好ましくは、タバコ (Nicotiana tabacum)、ビート (サトウダイコン: Beta vulgaris var. rapa, テーブルビート: Beta vulgaris var. rubra, フダンソウ: Beta vulgaris var. vulgaris, 又はベタ・ウルガリス・アルバ: Beta vulgaris var. alba)、若しくはサトウキビ (Saccharum officinarum)、又はこれらのプロトプラストが挙げられる。ビートやサトウキビは、スクロースを貯蔵する植物であり、それらのスクロース貯蔵器官又は組織において β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を発現させることにより、フラクトオリゴ糖の生産において

特に有利な効果を得られる。

本発明における β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物の植物の染色体へ導入する方法は、例えば、以下のようなリーフディスク法 (Horshら, Science, 227, 1229-1232, 1985) で行うのが好ましい。アグロバクテリウム・テュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) をストレプトマイシン (streptomycin) を添加したYEP液体培地において、例えば、28℃で8~9時間振盪培養した菌体を、常法に従い、プロトプラスト (コンピテントセル) を調製する。 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物を前述のコンピテントセルに加え、緩やかに混ぜた後に氷上に静置する。続いて、2mm電極幅キュベット (Gene Pulser/*E. coli* Pulse r™ Cuvette, BIO-RAD社製) に移し、エレクトロポレーション装置 [例えば、GENE PULSER (R) II system, BIO-RAD社製] で取扱説明書に従ってエレクトロポレーションを行う。処理後の試料にYEP液体培地を加えて28℃で2~4時間静置培養後、抗生物質 (例えば、カナマイシン) を含有するLB培地で培養して形質転換体を得ることができる。

この形質転換体をYEP液体培地で培養し、この培養液を無菌培養した植物の葉から採取したリーフディスクに漬けた後に、茎葉分化培地で培養してカルスを形成、増殖させる。植物用の茎葉分化培地としては、例えば、MS培地 (MurashigeとSkoog, Physiol. Plant., 15, 473-497, 1962) 等、公知の培地を使用することができる。その後を選択用の茎葉分化培地を用いて、カルスの選択を行えばよい。例えば、カナマイシン50 mg/L~200 mg/Lを加えたものを使用すればよい。

更に、植物体を再分化させるには、MS培地等の公知の培地にカナマイシン等を加えた根分化培地を用いて培養すればよい。発根した幼植物体を移植して栽培することにより植物体 (トランスジェニック植物) を得ることができる。その種子を栽培し、その子孫植物及びその種子を得ることができる。

なお、本明細書におけるトランスジェニック植物又は子孫植物における用語「植物」には、生物個体の全体としての植物体だけでなく、その一部である器官

(例えば、葉、茎、根、花、又は果実等)、組織、及び細胞などが含まれる。

トランスジェニック植物体中のフラクトオリゴ糖の採取・分析

本発明のトランスジェニック植物体内のフラクトオリゴ糖を採取・分析する方法として、例えば、以下のように行うことができる。植物体の各器官(根、茎、又は葉等)を液体窒素中で粉碎して一定量を秤量し、蒸留水を所定量加えて十分に攪拌する。遠心分離により上清を回収し、薄層クロマトグラフィー又は高速液体クロマトグラフィー等公知の方法で分析することにより、植物体におけるフラクトオリゴ糖の生成・蓄積を確認することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：タバコへのβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子の導入

(1) CaMV35Sプロモーターを含むバイナリーベクターの調製

国際公開第97/34004号パンフレット実施例A、実施例D1を参照して調製したプラスミドpAN120(同パンフレット図6)をBamHIで消化し、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) ATCC20611株由来のβ-フルクトフラノシダーゼ(FFase)cDNA(配列番号1)を含む約1.9kbのBamHI-BamHI断片を得た。pBI121(Clontech社製)をBamHIで消化し、前記のFFase cDNAを含むBamHI-BamHI断片とDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いて連結し、pBI121のCaMV35Sプロモーターの下流にFFase遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

(2) サツマイモのスポラミンAプロモーターを含むバイナリーベクターの調製

サツマイモのスポラミンAプロモーターをHattori, T., and Nakamura, K., "Plant Mol. Biol.", 11巻, 1988年, p. 417-426に記載の方法に従って調製した。得られたスポラミンAプロモーターを更にHindIIIで消化し、スポラミンAプロモーターのHindIII-HindIII断片(約1kbp)を得た。

pBI101 (Clontech社製) を SmaI、SacI で消化し、平滑化して自己連結させることにより、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を除去したプラスミド pBI101-GUS を得た。

pBI101-GUS を HindIII で消化し、前記のスプラミンAプロモーターの HindIII-HindIII 断片と DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて連結した。続けて、連結したプラスミドを BamHI で消化し、実施例1の(1)と同様に調製した FFase cDNA を含む BamHI-BamHI 断片と DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて連結し、pBI101-GUS の HindIII 部位にスプラミンAプロモーターが、その下流にある BamHI 部位に FFase 遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

(3) サツマイモのスプラミンBプロモーターを含むベクターの調製

サツマイモのスプラミンBプロモーターを Hattori, T., and Nakamura, K, "Plant Mol. Biol.", 11巻, 1988年, p. 417-426 に記載の方法に従って調製した。得られたスプラミンBプロモーターを更に HindIII 及び PstI で消化し、スプラミンBプロモーターの HindIII-PstI 断片 (約0.75 kbp) を得た。得られた断片を、pBlueScript KS (-) のマルチクロニングサイトに挿入した。得られたプラスミドを BamHI で消化し、実施例1の(1)と同様に調製した FFase cDNA を含む BamHI-BamHI 断片と DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて連結した。得られたプラスミドを HindIII、XbaI で消化し、スプラミンBプロモーターとその下流に FFase 遺伝子を含む約2.7 kbp の断片を得た。続いて、実施例1の(2)に記載の方法に従って調製したプラスミド pBI101-GUS を HindIII 及び XbaI で消化し、前記の約2.7 kbp の断片と DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて連結し、pBI101-GUS の HindIII-XbaI 部位に、スプラミンBプロモーターとその下流に FFase 遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

(4) タバコへの遺伝子導入と植物体再生

アグロバクテリウム・テュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (プラスミド, 7巻, 1982年, p. 15) を YEP 液体培地 (ストレプトマイシン添加) 250mL において 28°C で 8~9 時間振盪培養した (O. D. 600=0.5 まで)。

YEP 液体培地組成 (g/100mL)

バクトーペプトン	1 g
バクトーイーストエキストラクト	1 g
塩化ナトリウム	0.5 g

遠心分離した菌体に氷冷 10% グリセロール溶液 [9.31% (W/V) スクロース、10% (V/V) グリセロール、1mmol/L 塩化マグネシウム] 200mL を加えて懸濁する操作を 3 回繰り返した。更に、氷冷 10% グリセロール溶液 20~30mL を加え懸濁して遠心分離し、得られた菌体に氷冷 10% グリセロール溶液 400~600 μ L を加えて懸濁し、液体窒素で瞬間凍結してコンピテントセルとした。

実施例 1 の (1)、(2)、及び (3) で調製した 3 種のバイナリーベクター DNA 各 1 μ L を、それぞれ前記コンピテントセル 50 μ L に加え、緩やかに混ぜた後 30 秒以上氷上に静置後、2mm 電極幅キュベット (Gene Pluser/*E. coli* Pulser™ Cuvette, BIO-RAD 社製) に移し、エレクトロポレーション装置 [GENE PULSER (R) II system, BIO-RAD 社製] で取扱説明書に従ってエレクトロポレーションを行った。処理後の各試料に YEP 液体培地 1mL を加えて 28°C で 2~4 時間静置培養した後、カナマイシンを含有する LB 培地で培養して、3 種のバイナリーベクター DNA の各々で形質転換された形質転換体を得た。

LB 培地組成 (g/100mL)

バクトートリプトン	1 g
バクトーイーストエキストラクト	0.5 g
塩化ナトリウム	0.5 g
(カナマイシン	15 μ g/mL)

得られた各形質転換体を YEP 液体培地において 28°C で振盪培養して培養液

を得た (O. D. 550=1.0まで培養)。無菌培養したタバコ (Nicotiana tabacum Samsun NN株) の無菌葉から切り出したリーフディスク (5~7mm四方) をMS液体培地に浸し、前記培養液を加え、30分間静置した。

MS培地 (mg/L) (pH5.7)

NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.32
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
EDTA-Na ₂	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
ミオイノシトール	100
グリシン	2.0
ピリドキシン塩酸塩	0.5
ニコチン酸	0.5
チアミン塩酸塩	0.1
スクロース	30,000

寒天 (液体培地調製時は添加しない) 9

前記リーフディスクから、余分な培養液を滅菌済みの濾紙で除去し、MSシュート分化培地Aに葉の裏面を上にして植え、25℃暗所にて3~4日間培養した。リーフディスクをMSシュート分化培地Bに植え替え、25℃で16時間明所／

8時間暗所で培養した。3～4週間で新しいMSシュート分化培地Bに植え替え、シュートが1cmくらいまで伸びた後、シュートのみをMSシュート分化培地Cに植え替え、完全な植物体を得た。その後は、MS寒天培地に植え継いだ。なお、前記MSシュート分化培地A～Cは、MS培地に、それぞれ以下に示す化合物を添加した培地である。

MSシュート分化培地A

ストレプトマイシン 15mg/L

カナマイシン 150mg/L

MSシュート分化培地B

カルペニシリン 500mg/L

カナマイシン 150mg/L

MSシュート分化培地C

カナマイシン 100mg/L

(5) タバコ植物体への β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子導入の確認

(5a) タバコ植物体からの全DNA単離

実施例1の(1)、(2)、及び(3)のパイナリーベクターを用いて各々得られたタバコ植物体の葉組織50～100mgを採取し、 -80°C で冷凍した後、100 μL の抽出用緩衝液を加えて解凍した。

抽出用緩衝液

尿素 5mol/L

2-メルカプトエタノール 10mmol/L

フェノール 5% (v/v)

滅菌水 1容量

2×抽出用緩衝液ストック溶液(組成は下記) 1容量

NaCl 0.6mol/L

Tris-HCl (pH7.5) 0.1mol/L

EDTA (pH 8.0)

40 mmol/L

SDS

1% (w/v)

超音波破碎機で葉組織を1～2分間磨碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて、添付の取扱説明書に記載の方法に従ってタバコ植物体の全DNAを得た。

(5b) PCR法による導入遺伝子の検出

β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を導入した領域の上流・下流となる領域の配列をもとにプライマーを設計した。

実施例1の(1)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プライマーとして、CaMV35Sプロモーター領域3'側、及び nos-Ter 領域5'側の配列をもとに、以下のプライマーを設計した。

CaMV35S:

5'-TTCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCA-3' (配列番号2)

nos-Ter :

5'-ATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATA-3' (配列番号3)

実施例1の(2)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プライマーとして、上流側にサツマイモ由来スポラミンAプロモーターを調製する際に用いたプライマー(SPOA1S)、下流側に β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子配列の下流領域をもとに設計したプライマー(FFaseRev)を使用した。

SPOA1S:

5'-TAAGCTTAATTTACTAATTTGGGGTTTTTAC-3' (配列番号4)

FFaseRev:

5'-AGAGCCCCTCCGACACGGAGACATTCC-3' (配列番号5)

実施例1の(3)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プラ

イマーとして、上流側にサツマイモ由来スポラミンBプロモーターを調製する際に用いたプライマー（SPOB1S2）、下流側に β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子配列の下流領域をもとに設計したプライマー（前記のFFaseRev：配列番号5）を使用した。

SPOB1S2：

5'-TAAGCTTTAGGTTCACTCACCTTAAGTTTC-3'

（配列番号6）

実施例1の（5a）で調製した、各植物体の全DNAを鋳型として用いてPCR反応を行い、増幅された遺伝子断片を観察した。実施例1の（1）のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の全DNAからは、 β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子（約1.9 kbp）+GUS遺伝子（約2 kbp）の合計約4 kbpの断片が確認された。また、実施例1の（2）又は（3）のバイナリーベクターを用いて得られた各植物体の全DNAからは、スポラミンプロモーター（約1 kbp）+ β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子（約1.9 kbp）の合計約3 kbpの断片がそれぞれ確認された。

実施例2：タバコ植物体内のフラクトオリゴ糖の分析

実施例1の（3）のバイナリーベクター（サツマイモのスポラミンBプロモーターを含有する）を用いて、実施例1の（4）に記載の方法で得られたタバコ形質転換体の茎中のフラクトオリゴ糖を以下のように分析した。同様の方法で、形質転換を行っていないタバコ親株についても分析を行った。

30 cm以上に成長したタバコ植物体の茎下部約1.5 g生重量を液体窒素存在下で磨砕し、純水1.5 mLを加えて攪拌した。80℃～85℃で1.5時間保温後、遠心分離した上清を分析に供した。高速液体クロマトグラフィー分析は、検出器：示差屈折計410（Waters社製）、カラム：ハイパーリクロカート250-4リクロスフェア100NH2 4mm I.D. × 250mm（関東化学社製）を用いて行い、分析条件は、移動相：アセトニトリル：水＝72：28、流速：毎分1.0 mL、温度：40℃で行った。その結果を表1に示した。

表 1

	タバコ (親株) ($\mu\text{mol/g FW}$)	タバコ (本発明のトランス ジェニック植物) ($\mu\text{mol/g FW}$)
フルクトース	1. 8	3. 0
グルコース	4. 8	8. 9
スクロース	15. 7	9. 8
1-kestose	0. 0	3. 6
ニストース	0. 0	0. 9

フラクトオリゴ糖を全く生産しないタバコの茎中において、本発明の方法で形質転換されたタバコ (トランスジェニック植物) はフラクトオリゴ糖の成分である1-kestose (GF_2) 及びニストース (GF_3) を顕著に生成・蓄積していることが確認された。また、表 1 には示していないが、1-kestose の異性体、すなわち、6-kestose 及びネオkestose は検出されなかった。

実施例 3 : ビートへの β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の導入及びビート植物体内のフラクトオリゴ糖の分析

実施例 1 (4) と同様にアグロバクテリウム法によりフルクトフラノシダーゼ遺伝子をビートに導入した。なお、導入する β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子としては、実施例 1 (1) で調製したバイナリーベクターを使用した。

遺伝子導入後の植物個体再生までの操作は、以下に示すとおり、使用した培地を若干変更したこと以外は、実施例 1 (4) と同様に実施した。すなわち、ビート葉から切り出したリーフディスクに遺伝子を導入した後、MSシュート分化培地 D で培養し、MSシュート分化培地 E に植え替え、シュートが十分に 1 cm 以上に生育してから、MSシュート分化培地 C に植え替え、植物個体の再生を行った。なお、前記 MSシュート分化培地 D 及び E は、MS 培地に、それぞれ以下に示す化合物を添加した培地である。

MSシュート分化培地 D

ナフチル酢酸

1 mg/L

ストレプトマイシン	15mg/L
カナマイシン	150mg/L

MSシュート分化培地E

ベンジルアデニン	1mg/L
ナフチル酢酸	1mg/L
ストレプトマイシン	15mg/L
カナマイシン	150mg/L

ビート植物体の葉0.3gFW(fresh weight)を液体窒素存在下で磨砕し、純水1mLを加えて攪拌した。80~85℃で1.5時間保温後、遠心分離した上清を実施例2と同じHPLC分析に供した。その結果、0.15 $\mu\text{mol/gFW}$ の1-kestoseが検出された。また、1-kestoseの異性体、すなわち、6-kestose及びneo-kestoseは検出されなかった。

産業上の利用可能性

本発明により、フラクトオリゴ糖を植物体内に高含量かつ高純度で蓄積させたトランスジェニック植物が得られ、フラクトオリゴ糖を効率よく産生することができる。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号2~6の配列で表される各塩基配列は、それぞれ、プライマーCAMV35S、プライマーnos-Ter、プライマーSPOA1S、プライマーFFaseRev、及びプライマーSPOB1S2である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物で植物を形質転換する工程を含む、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法。
2. β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス (Aspergillus) 属に属する微生物由来、ペニシリウム (Penicillium) 属に属する微生物由来、又はスコプラリオプシス (Scopulariopsis) 属に属する微生物由来である、請求項1に記載の方法。
3. β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 由来である、請求項2に記載の方法。
4. β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、下記からなる群より選択される、請求項1に記載の方法：
 - (a) 配列番号1で表わされる塩基配列からなる遺伝子、
 - (b) 配列番号1で表わされる塩基配列を含む遺伝子、
 - (c) 配列番号1で表わされる塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、又は付加された塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、及び
 - (d) 配列番号1で表される塩基配列と85%以上の相同性を有する塩基配列を含み、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子。
5. 遺伝子構築物が、構成的プロモーター、器官特異的プロモーター、又は生育ステージ特異的プロモーターに機能し得るように連結された β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
6. プロモーターが、下記からなる群より選択される、請求項5に記載の方法：
 - (i) CaMV35Sプロモーター、
 - (ii) サツマイモのスボラミンAプロモーター、及び
 - (iii) サツマイモのスボラミンBプロモーター。
7. トランスジェニック植物が、双子葉植物又は単子葉植物である、請求項1～

6のいずれか一項に記載の方法。

8. トランスジェニック植物が、ナス科、アカザ科、又はイネ科に属する植物である、請求項7に記載の方法。

9. トランスジェニック植物が、タバコ属、フダンソウ属、又はサトウキビ属に属する植物である、請求項8に記載の方法。

10. 請求項1～9のいずれか一項に記載の方法により作出されたトランスジェニック植物又はその子孫植物。

11. 請求項10に記載のトランスジェニック植物又はその子孫植物の種子。

12. 請求項10に記載の植物若しくは子孫植物又は請求項11に記載の種子を栽培する工程、及び植物体内に蓄積されたフラクトオリゴ糖を採取する工程を含む、フラクトオリゴ糖の製造法。

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Transgenic plants modified to accumulate fructooligosaccharides and production thereof

<130> MEJ-708

<150> JP 2003-055220

<151> 2003-03-03

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1965

<212> DNA

<213> Aspergillus niger ACE-2-1 (ATCC20611)

<400> 1

atgaagctca ccactaccac cctggcgctc gccaccggcg cagcagcago agaagcctca	60
taccacctgg acaccacggc cccgcccgcg accaacctca gcacctccc caacaacacc	120
ctcttcacg tgtggcggcc gcgcgcgcac atcctgcccg ccgagggccca gatcggcgac	180
ccctgcgcgc actacaccga cccatccacc ggcctcttcc acgtgggggtt cctgcacgac	240
ggggacggca tcgcgggcgc caccacggcc aacctggcca cctacaccga tacctccgat	300
aacgggagct tcctgatcca gccggggcggg aagaacgacc ccgtcgccgt gttcgacggc	360
gccgtcatcc ccgtcgccgt caacaacacc cccaccttac tctacacctc cgtctccttc	420
ctgcccaccc actggtccat cccctacacc cgcggcagcg agacgcagtc gttggccgtc	480
gcgcgcgacg gcggccgcgc cttcgacaag ctgcaccagg gccccgtcat cgccgaccac	540
cccttcgcgc tcgacgtcac cgccttcgcg gatccgtttg tottcgcgag tgccaagttg	600
gatgtgctgc tgtcgttgga tgaggaggtg gcgcggaatg agacggccgt gcagcaggcc	660

gtcgatggct ggaccgagaa gaacgcccc tggatgtcg cggctctctg cggggtgcac 720
ggcgtcgggc ccgcgcagtt cctctaccgc cagaacggcg ggaacgcttc cgagttccag 780
tactgggagt acctcgggga gtggtggcag gaggcgacca actccagctg gggcgacgag 840
ggcacctggg cggggcgctg ggggttcaac ttcgagacgg ggaatgtgct ctctctcacc 900
gaggagggcc atgaccccca gacgggcgag gtgttcgtca ccctcggcac ggaggggtct 960
ggcctgocaa tcgtgccgca ggtctccagt atccacgata tgctgtgggc ggcggggtgag 1020
gtcgggggtg gcagtgagca ggaggggtgc aaggtcgagt tctccccctc catggccggg 1080
tttctggact gggggttcag cgcctacgt gcggcgggca aggtgctgcc ggccagctcg 1140
gcggtgtoga agaccagcgg cgtggaggtg gatcggtatg tctcgttcgt ctggttgacg 1200
ggcgaccagt acgagcaggc ggacgggttc cccacggccc agcaggggtg gacggggctg 1260
ctgctgtctg ccgcgcgagct gaaggtgcag acggtggaga acgtcgtcga caacgagctg 1320
gtgcgcgagg agggcgtgtc gtgggtggtg ggggagtcgg acaaccagac ggccaggctg 1380
cgcacgctgg ggatcacgat cgcccgggag accaaggcgg ccctgctggc caacggctcg 1440
gtgaccgcgg aggaggaccg cacgctgcag acggcggccg tcgtgccgtt cgcgcaatcg 1500
ccgagctcca agttcttcgt gctgacggcc cagctggagt tccccgcgag cgcgcgctcg 1560
tccccgctcc agtcggggtt cgaaatcctg gcgtcggagc tggagcgcac ggccatctac 1620
taccagttca gcaacgagtc gctggtcgtc gaccgcagcc agactagtgc ggcggcgccc 1680
acgaaccccg ggctggatag ctttactgag tccggcaagt tgcggttggt cgacgtgato 1740
gagaacggcc aggagcaggt cgagacgttg gatctcactg tcgtcgtgga taacgcggtt 1800
gtcgaggtgt atgccaacgg gcgctttgcg ttgagcacct gggcgagatc gtggtacgac 1860
aactccacc agatccgctt ctccacaac ggcgagggcg aggtgcagtt caggaatgtc 1920
tccgtgtcgg aggggctcta taacgcctgg ccggagagaa attga 1965

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer CAMV35S

<400> 2

ttcctctata taaggaagtt catttca

27

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer nos-Ter

<400> 3

ataatttatc ctagtttgcg cgctata

27

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer SPOA1S

<400> 4

taagcttaat ttactaattt ggggttttac

30

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer FFaseRev

WO 2004/078966

PCT/JP2004/002564

4/4

<400> 5

agagcccctc cgacacggag acattcc

27

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer SPOB1S2

<400> 6

taagcttttag gttcactcac cttaagtttc

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01H5/00, A01H5/10, C07H3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01H5/00, A01H5/10, C07H3/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hellwege, E.M. et al., Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose sucrose 1-fructosyl transferase of artichoke (cynara scolymus) blossom discs, Plant J, 1997 Vol.12, No.5, pages 1057 to 1065	1-12
Y	WO 01/36622 A2 (DE POND NEMOURS AND CO.), 25 May, 2001 (25.05.01), & AU 200116610 A & EP 1235904 A2 & HU 200203349 A & MX 2002004988 A1	1-12
Y	WO 97/34004 A1 (MEIJI SEIKA KAISHA), 18 September, 1997 (18.09.97), & AU 9722338 A & EP 889134 A1 & JP 9-532435 A & US 6337201 B1 & US 2002/192771 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 April, 2004 (01.04.04)

Date of mailing of the international search report

20 April, 2004 (20.04.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002564

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/01904 A1 (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK IN NEDERLAND), 25 January, 1996 (25.01.96), & NL 9401140 A & AU 9528091 A & EP 774007 A1 & JP 10-504711 A & AU 701190 B & NZ 288753 A & US 6147280 A	1-12
A	WO 03/000854 A2 (SES EUROPE N.V./S.A.), 03 January, 2003 (03.01.03), (Family: none)	1-12
A	Sevenier, R. et al., High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet, Nat Biotechnol, 1998, Vol.16, No.9, pages 843 to 846	1-12
A	van der Meer, I.M. et al., Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke, Plant J, 1998, Vol.15, No.4, pages 489 to 500	1-12
P,X	US 2003/0213013 A1 (Caimi, Perry G.; Lightner, Jonathan E.), 13 November, 2003 (13.11.03), (Family: none)	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002564

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/002564

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N15/09, A01H5/00, A01H5/10, C07H3/06			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N15/09, A01H5/00, A01H5/10, C07H3/06			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
Y	Hellwege, E. M. et al., Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (Cynara scolymus) blossom discs, Plant J, 1997, Vol. 12, No. 5, pp. 1057-1065		1-12
Y	WO 01/36622 A2 (DE PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2001.05.25 & AU 200116610 A & EP 1235904 A2 & HU 200203349 A & MX 2002004988 A1		1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 01.04.2004		国際調査報告の発送日 20.4.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 七條 里美	4B 2936
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 97/34004 A1 (MEIJI SEIKA KAISHA) 1997.09.18 & AU 9722338 A & EP 889134 A1 & JP 9-532435 A & US 6337201 B1 & US 2002/192771 A1	1-12
A	WO 96/01904 A1 (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK IN NEDERLAND) 1996.01.25 & NL 9401140 A & AU 9528091 A & EP 774007 A1 & JP 10-504711 A & AU 701190 B & NZ 288753 A & US 6147280 A	1-12
A	WO 03/000854 A2 (SES EUROPE N.V./S.A.) 2003.01.03 (ファミリーなし)	1-12
A	Sevenier, R. et al., High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet, Nat Biotechnol, 1998, Vol.16, No.9, pp. 843-846	1-12
A	van der Meer, I.M. et al., Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke, Plant J, 1998, Vol.15, No.4, pp.489-500	1-12
PX	US 2003/0213013 A1 (Caimi, Perry G.; Lightner, Jonathan E.) 2003.11.13 (ファミリーなし)	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/002564

第I欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、
以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.